

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. Mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/044238 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/012756

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. November 2002 (14.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER  
[DE/DE]; Carl-Neuberg-Str. 1, 30623 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIM, Albert,  
Roland [DE/DE]; Rotekreuzstr. 9, 30627 Hannover (DE).

PRING-AKERBLOM, Patricia [GB/DE]; Peperfeld 7,  
30457 Hannover (DE).

(74) Anwalt: STILKENBÖHMER, Uwe; Eisenführ, Speiser  
& Partner, Martinistrasse 24, 28195 Bremen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: AGENTS AND METHODS FOR DETECTING HUMAN ADENOVIRUSES

(54) Bezeichnung: MITTEL UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS HUMANER ADENOVIREN

18861  
HADV-2 (C) TGGCCGAGTG GTCTTACATG CACATCTCGG GCCAGGAGGC CTGGAGTAC CTGAGCCCG  
HADV-3 (B1) C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-4 (E) C...C...G...G...C...A...T...G...  
HADV-5 (C) C...C...G...G...C...A...T...G...  
HADV-12 (A) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-17 (D) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-34 (B2) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-40 (F) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-41 (F) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
HADV-48 (D) T...C...A...G...G...C...A...T...G...  
consensus C...C...G...G...C...A...T...G... (=AQ2)

18921  
HADV-2 (C) GGCTGGTGCA GTTGGCCGGC GCCACCGAGA COTACTTCAG CTGGAATAC AAGTTTAGAA  
HADV-3 (B1) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-4 (E) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-5 (C) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-12 (A) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-17 (D) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-34 (B2) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-40 (F) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-41 (F) T...C...A...C...C...A...T...G...  
HADV-48 (D) T...C...A...C...C...A...T...G...  
consensus T...C...A...C...C...A...T...G... (=AP)

MELTING TEMPERATURE (°C)  
Schmelztemperatur (°C)  
18981  
HADV-2 (C) ACCCCACGGT GCCACCTACG  
HADV-3 (B1) A...G...C...C...  
HADV-4 (E) A...G...C...C...  
HADV-5 (C) A...G...C...C...  
HADV-12 (A) A...G...C...C...  
HADV-17 (D) A...G...C...C...  
HADV-34 (B2) A...G...C...C...  
HADV-40 (F) A...G...C...C...  
HADV-41 (F) A...G...C...C...  
HADV-48 (D) A...G...C...C...  
consensus A...G...C...C... (=AQ1)

(57) Abstract: The invention relates to labeled  
or unlabeled nucleic acids for specifically binding  
to DNA of human adenoviruses (HAdV-DNA),  
whereby the nucleic acid: a) comprises the  
sequence SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 or  
SEQ ID NO. 3; b) comprises a sequence having  
a homology of greater than 78 % to SEQ ID  
NO. 1, SEQ ID NO. 2 or SEQ ID NO. 3 or; is  
complementary to a nucleic acid according to a)  
or b). The invention also relates to methods for  
detecting HAdV-DNA.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden  
markierte oder unmarkierte Nukleinsäure zum  
spezifischen Binden an DNA humaner Adenoviren  
(HAdV-DNA), wobei die Nukleinsäure a) die  
Sequenz SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 oder  
SEQ ID NO. 3 besitzt, b) eine Sequenz mit einer  
Homologie von mehr als 78% zu SEQ ID NO. 1,  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt oder  
c) komplementär zu einer Nukleinsäure nach a)  
oder b) ist. Beschrieben werden zudem Verfahren  
zum Nachweis von HAdV-DNA.

"EXPRESS MAIL" LABEL NO.: EV632220208US  
I HEREBY CERTIFY THAT THIS PAPER IS BEING DEPOSITED WITH THE  
UNITED STATES POSTAL SERVICE "EXPRESS MAIL POST OFFICE TO  
ADDRESSEE" SERVICE UNDER 37 CFR. 1.10 IN AN ENVELOPE ADDRESSED  
TO: THE COMMISSIONER OF PATENTS, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA  
22313-1450, ON THIS DATE. THE COMMISSIONER IS HEREBY AUTHORIZED  
TO CHARGE ANY FEES ARISING HEREFROM AT ANY TIME TO DEPOSIT  
ACCOUNT 18-0877.  
5/16/05  
DATE  
Signature  
SIGNATURE



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Straße 1, 30623 Hannover

---

Mittel und Verfahren zum Nachweis humaner Adenoviren

---

Die vorliegende Erfindung betrifft Primer, Sonden sowie ein Kit daraus als Hilfsmittel für den Nachweis humaner Adenoviren. Sie betrifft auch Nachweisverfahren, bei denen die DNA von 15 oder mehr HAdV-Serotypen erfasst werden können.

Die 6 Spezies (früher Subgeneri) der humanen Adenoviren (HAdV) mit ihren 51 Serotypen sind mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert, die alle Organsysteme betreffen können (vergleiche Wadell, G., A. Allard, and H. Hierholzer. 1999. Adenovirus, p. 970-981. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, C. A. Tenover, and R. A. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.). Beispiele für solche Krankheiten sind akute Atemwegserkrankungen bei kleinen Kindern, schwere Lungenentzündungen, pharyngokonjunktives Fieber (PCF), epidemische Keratokonjunktivitis (EKC), eiternde Genitallesionen, Gebärmutterhalsentzündung, Gastroenteritis und

Harnleiterentzündung. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten wie z.B. Empfängern von Organ- oder Knochenmarkstransplantationen führen ursprünglich latente Infektionen der Polypen oder des Urogenitaltraktes zu erheblichen Belastungen mit HAdV verschiedener Serotypen.

5

Ein üblicher Weg für die Diagnose von HAdV-Infektionen ist die Virus-Isolierung mit nachfolgender Typisierung. Es kann aber bis zu drei Wochen dauern, bis sich ein cytopathischer Effekt entwickelt und einige HAdV-Typen wachsen langsam und ineffektiv in Kultur oder benötigen spezielle Zelllinien wie 293-Graham-Zellen zur Isolierung. Deshalb haben viele Forschergruppen PCR-Protokolle für den Nachweis von HAdV in klinischen Proben entwickelt. Die meisten dieser PCRs wurden als „generische Protokolle“ zum Nachweis von möglichst allen Typen des Genus HAdV erstellt (Allard, A., B.Albinsson, and G. Wadell: 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol. 39(2):498-505; Echavarria, M., M. Forman, J. Ticehurst, J. S. Dumler, and P. Charache.1998. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol. 36(11):3323-6; Pring-Akerblom, P., and T. Adrian. 1994. Type- and group-specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. Res Virol. 145(1):25-35).

10  
15  
20

Die genannten Schriften offenbaren entweder nur Mittel und Verfahren zum Nachweis einer geringen Zahl von HAdV-Serotypen oder beschreiben für den Einsatz in der PCR nur degenerierte Primer, was tatsächlich die Verwendung einer Vielzahl von Primerpaaren bedeutet, von denen jedes einzelne in den beschriebenen Systemen jeweils nur eine geringe Zahl von HAdV-Serotypen spezifisch bindet. Eine Sonde zum Nachweis von HAdV-DNA ist nicht offen-

25  
30

Im Rahmen des vorliegenden Textes gelten folgende Definitionen:

Primer: Kurzes DNA- oder RNA-Oligonukleotid, das den Anfangspunkt der DNA-Synthese während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) darstellen und diesen Basenabfolge für jede Position der Sequenz vollständig beschrieben

35

werden kann durch die Angabe jeweils einer der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin bzw. Uracil.

5 Degenerierter Primer: Gemisch von Primern, die in der textlichen Wiedergabe üblicherweise in einer einzigen Sequenz zusammengefasst werden, indem an den Positionen der Sequenz, an denen einzelne der Primer des Gemisches zu einander verschieden sind, Variablen eingefügt sind, die für jede im Primergemisch an der betreffenden Stelle der Sequenz vorhandene Base stehen können.

10

Primerpaar: Zwei Primer, von denen je einer an je einen der zwei DNA-Stränge einer DNA spezifisch binden kann, so dass mittels einer PCR der zwischen diesen beiden Primern liegende Bereich der DNA (einschließlich der Abschnitte, an die die Primer binden) amplifiziert werden kann.

15

Sonde: Nukleinsäuresequenz, die in einzelsträngiger, in der Regel markierter Form, zur Hybridisierung in Form einer spezifischen Bindung mit komplementären oder den komplementären verwandten Sequenzen befähigt ist und dadurch deren qualitative oder quantitative Bestimmung ermöglicht.

20

Spezifische Bindung: Hybridisierung einer Sonde oder eines Primers mit einer Nukleinsäure mit nicht mehr als 20% Fehlpaarungen (mismatches) zwischen den Basen von Sonde oder Primer und der besagten Nukleinsäure.

25 Fehlpaarungen: Basenpaarungen, die nicht aus der Kombination von (a) Cytosin (C) und Guanin (G) oder (b) Adenin (A) und Thymin (T) oder (c) Adenin (A) und Uracil (U) (letzteres für den Fall der DNA/RNA-Hybride) gebildet sind.

30 Alle bzw. alle bekannten HAdV-Serotypen: Die HAdV-Serotypen gemäß N.N. (2000): Adenoviridae, pp. 227-238. In: M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (Eds): Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of  
35 Viruses, Academic Press, New York, San Diego.

Homologie: Bezeichnung für den Grad der Übereinstimmung von zwei DNA- oder einer DNA- und einer RNA-Sequenz. Der Grad der Homologie (in %) entspricht dem Grad (in %) der durch den Vergleich der beiden Sequenzen mit Hilfe des Programmes EMBOSS::needle (global) (Einstellungen: Gap Open: 10.0; Gap Extend: 0.5; Molecule: DNA; Matrix: DNAfull) ermittelten Identität. (Das genannte Programm implementiert den Alignieralgorithmus von Needleman and Wunsch; vergleiche Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48, 443-453.) Für den Vergleich von RNA- mit DNA-Sequenzen erfolgt dabei die Eingabe der RNA-Sequenz unter Austausch des U (für Uracil) durch T.

Komplementär: Komplementarität zwischen den Sequenzen zweier Nukleinsäuren besteht dann, wenn diese ohne Fehlpaarung miteinander hybridisiert werden können. Für DNA- / RNA-Hybride gelten A – T- und A – U-Paarungen dabei nicht als Fehlpaarung.

Quantitative Detektion: Ermittlung der Konzentration der DNA zu untersuchender HAdV-Viren in Proben zumindest relativ zueinander zu ermittelt. Bevorzugt erlaubt die quantitative Detektion (Quantifikation) auch den Rückschluss auf die absolute Konzentration der genannten DNA.

Charakterisieren: Durchführung eines oder mehrerer informationsbeschaffender Schritte, die (a) eine Zuordnung von DNA zu dem Organismus oder Virus ermöglichen, aus dem sie stammt, oder (b) zu dem Resultat führen, dass für eine Zuordnung der DNA zum Herkunftsorganismus bzw. -virus noch nicht genügend Informationen im Stand der Technik vorhanden sind.

Ein aus medizinischer und molekularbiologischer Sicht enorm störendes technisches Problem für den gleichzeitigen Nachweis von DNA-Material, das aus einer größeren Zahl von HAdV-Serotypen stammen kann, ist die hohe Sequenzdiversität der HAdV. Diese macht es nämlich nahezu unmöglich, in den Genomen der HAdV-Serotypen Regionen zu finden, die jeweils eine spezifi-

sche Bindung einzelner PCR-Primer und/oder Sonden an eine größere Zahl von HAdV-DNA-Sequenzen unterschiedlicher Serotypen ermöglichen.

Primäre Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, (a) Primer und/oder  
5 (b) Sonden zu ermitteln, die (a) eine spezifische Vervielfältigung und/oder  
(b) den spezifischen Nachweis der DNA einer größeren Zahl unterschiedlicher  
HAdV-Serotypen ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch markierte oder unmarkierte  
10 Nukleinsäure zum spezifischen Binden an DNA humaner Adenoviren (HAdV-  
DNA), wobei die Nukleinsäure  
a) die Sequenz SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt,  
b) eine Sequenz mit einer Homologie von mehr als 78% zu SEQ ID NO. 1,  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt oder  
15 c) komplementär zu einer Nukleinsäure nach a) oder b) ist.

Für die Markierung der Nukleinsäure stehen dem Fachmann eine Reihe von  
Möglichkeiten zur Verfügung wie z.B. Fluoreszenz-, Lumineszenz-, Farb-, oder  
radioaktive Markierung oder Enzyme, die die Bildung nachweisbarer Reakti-  
20 onsprodukte katalysieren, oder Feststoffe wie beispielsweise Metallpartikel wie  
magnetische Bits.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass bei Einsatz von Primern der SEQ  
ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 als Primerpaar in einer PCR die Amplifikation von  
25 DNA aller HAdV-Serotypen aufgrund spezifischer Bindung der Primer erreicht  
wird. Noch erstaunlicher ist es, dass zudem in dem von den Primern begrenz-  
ten Bereich auf der DNA jedes Serotypen ein Abschnitt vorhanden ist, an den  
eine Sonde der SEQ ID NO. 3 (oder einer zu SEQ ID No. 3 komplementären  
Sequenz) spezifisch binden kann. Es hat sich zudem bei der Verwendung der  
30 genannten Nukleinsäuren als Primer und Sonde herausgestellt, dass diese  
unter stringenten Bedingungen ( $\geq 50^\circ\text{C}$ , bevorzugt  $\geq 55^\circ\text{C}$ ) in der Lage sind,  
an die DNA von 45, bevorzugt allen derzeit bekannten HAdV-Serotypen spezi-  
fisch zu binden.

Ebenso überraschend ist die Tatsache, dass trotz der hohen Sequenzdiversität der DNA der HAdV-Serotypen die drei konservierten Abschnitte, an die die genannten Primer und Sonden binden, bei sämtlichen in diesem Bereich bereits sequenzierten HAdV-Serotypen in einem verhältnismäßig kurzen Bereich von weniger als 150 Basen liegen.

Dementsprechend ist die Kombination von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in Form von Primern der SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 und einer Sonde der SEQ ID NO. 3 (oder der dazu komplementären Sequenz) ein in Nachweisverfahren für die DNA von HAdV besonders vorteilhaft einsetzbares Ensemble.

Zusätzlich erstaunlich war, dass in der Praxis die genannten Primer und die Sonde sogar noch bei Anlagerungstemperaturen, die größer als die berechnete theoretische Schmelztemperatur der Primer mit ihren Bindungsabschnitten auf der DNA einzelner HAdV-Serotypen sind, zur Anlagerung befähigt waren und damit auch die Amplifikation der DNA dieser Serotypen zuverlässig ermöglichen bzw. die DNA nachweisen konnten (vergleiche Fig. 1, multiples Alignment, sowie Beispiele).

Selbstverständlich ist in manchen Fällen auch die Kombination der erfindungsgemäßen Nukleinsäure der SEQ ID NO. 1 mit der der SEQ ID NO. 3 oder der SEQ ID NO. 2 mit der zu SEQ ID NO. 3 komplementären Sequenz zu Primerpaaren sinnvoll, insbesondere wenn es nur auf die Möglichkeit der Amplifikation der DNA aller HAdV-Serotypen ankommt.

Ebenso können (bei entsprechender Markierung) die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren der SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 sowie die dazu komplementären Nukleinsäuren als spezifische Sonden für den Nachweis von DNA aller HAdV-Serotypen verwendet werden.

Oft ist es in der medizinischen Praxis nicht notwendig, die DNA aller HAdV-Serotypen zu amplifizieren oder nachzuweisen. Experimente, Überlegungen und Berechnungen haben insoweit ergeben, dass erfindungsgemäße Nukleinsäuren, deren Sequenz eine Homologie > 78% zu den SEQ ID NO. 1,



- SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt, noch immer an eine große Zahl der DNA der HAdV-Serotypen spezifisch binden können. >78% Homologie bedeutet dabei z.B. im Falle der SEQ ID NO. 1, dass die homologe Sequenz an bis zu 5 Positionen der Basenabfolge von der SEQ ID NO. 1 abweichen kann.
- 5 Bevorzugt sind selbstverständlich erfindungsgemäße Nukleinsäuren, mit einer höheren Homologie zu den Sequenzen der genannten SEQ IDs wie etwa solche mit > 82%, > 86%, > 91% und > 95%, wobei jede Prozentangabe bezogen auf SEQ ID NO. 1 eine Positionsabweichung weniger zulässt.
- 10 Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Sonde oder Primer so ausgewählt, dass sie befähigt sind, spezifisch an die DNA von  $\geq 15$ ,  $\geq 25$ ,  $\geq 30$ ,  $\geq 35$ ,  $\geq 40$  oder sogar  $\geq 45$  HAdV-Serotypen zu binden. Diese Fähigkeit kann der Fachmann durch Experimente oder den datenbankgeschützten Sequenzvergleich einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit der DNA
- 15 der einzelnen HAdV-Serotypen ermitteln. In den Sequenzvergleich können dabei alle HAdV-Serotypen einbezogen werden, deren Sequenz im Bereich des Bindungsabschnittes der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren (das ist das Hexon-Gen) bekannt ist.
- 20 Bestandteil der Erfindung ist auch ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren ermittelt werden können, die als Primer und Sonden (ebenfalls) an eine große Zahl der DNA der unterschiedlichen HAdV-Serotypen spezifisch binden können:
- 25 - Dazu wird in einem ersten Schritt die genetische Variabilität verschiedener Regionen der Genome der bereits komplett sequenzierten HAdV mit Hilfe eines multiplen Alignments dieser Genomdaten analysiert.
- In einem zweiten Schritt wird einer oder werden mehrere hoch konservierte Abschnitte von ca. 20 Basenpaaren Länge bestimmt. In einer bevorzugten
- 30 Ausführung werden dabei drei hochkonservierte Abschnitte in einem Bereich von weniger als 1000 (bevorzugt weniger als 500, wiederum bevorzugt weniger als 200) Basenpaaren Länge ermittelt.
- In einem dritten Schritt erfolgt eine erneute Analyse des oder der ermittelten Genomabschnitte bzw. des ermittelten Bereiches mit den drei hochkonservierten Abschnitten mit Hilfe eines weiteren multiplen Alignments, das vorzugs-
- 35

weise sämtliche verfügbaren HAdV-Sequenzdaten, also auch die bereits bekannten Daten von HAdV-Serotypen, die noch nicht vollständig sequenziert sind, berücksichtigt.

- 5 - In einem letzten Schritt werden mit Hilfe des zweiten multiplen Alignments eine, zwei oder bevorzugt drei Konsensussequenzen ermittelt, die durch Schmelztemperaturberechnungen für die Hybridisierung der Primer- bzw. Sondensequenzen mit den bekannten Sequenzen des multiplen Alignments so gewählt werden, dass eine effektive spezifische Sonden- bzw. Primerbindung an die DNA der oben genannten großen Zahl von HAdV-Serotypen zu  
10 erwarten ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
- 15 - Bereitstellen einer Sonde, die jeweils spezifisch an die DNA von zumindest 35 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
- Vermischen der Sonde mit der Probe,
- Amplifizieren von Bereichen jeder der in der Probe tatsächlich enthaltenen DNA der 35 HAdV-Serotypen, so dass der Abschnitt, an den die  
20 genannte Sonde spezifisch binden kann, mit amplifiziert wird,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung der Sonde an Abschnitte der amplifizierten Bereiche ermöglichen,
- Detektieren amplifizierter DNA-Abschnitte, an die eine Sonde gebunden ist.

25

Bevorzugt ist, dass die Sonde so ausgewählt ist, dass sie nicht nur an die DNA von 35 sondern an die DNA von  $\geq 40$ , wiederum bevorzugt  $\geq 45$ , wiederum bevorzugt allen HAdV-Serotypen spezifisch binden kann.

- 30 Bevorzugt wird dabei als Sonde eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine (a) mit der Sequenz der SEQ ID NO. 3 (b) mit einer Sequenz mit einer Homologie  $> 78\%$  zu SEQ ID NO. 3 oder (c) mit einer zu (a) oder (b) komplementären Sequenz verwendet.

Die bereitzustellende Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält, wird mit dem Fachmann geläufigen Methoden aus klinischen oder anderen Proben wie z.B. Zellkulturen, Blut, Plasma, Serum, Stuhl, Sputum, Urin, augen- oder nasopharyngealen Abstrichen oder cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) für den Einsatz in  
5 einem DNA-Amplifikationsverfahren, bevorzugt einer PCR vorbereitet: Die Bedingungen, die eine spezifische Bindung der jeweiligen Sonde ermöglichen, wird der Fachmann leicht über die Variation geeigneter Parameter, insbesondere über die Variation der Temperatur einstellen.

10 Die erfindungsgemäß vorgesehene Amplifikation von DNA wird in den meisten Fällen über das PCR-Verfahren erfolgen. Sie kann aber auch auf anderen Wegen erfolgen, z.B. durch Virusvermehrung oder Vektorvervielfältigung.

Die Detektion der amplifizierten DNA-Abschnitte, an die eine Sonde gebunden  
15 ist, kann je nach Wahl der Markierung der Sonde und der Sonde selbst durch Verfahren wie z.B. Northernblot-, Westernblot-, Chemolumineszenz- oder Fluoreszenz-Verfahren erfolgen.

Es ist zu betonen, dass die Reihenfolge der Schritte des erfindungsgemäßen  
20 Verfahrens den Erfordernissen angepasst werden kann und einzelne oder die Abfolge mehrerer Schritte auch gegebenenfalls (mehrfach) wiederholt werden können. Letzteres betrifft insbesondere die für eine PCR typischen Schritte. Das Vermischen der Sonde mit der Probe wird in vielen Fällen – abhängig vom Nachweisverfahren – erst nach dem oder den Amplifizierungsschritten  
25 erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den Vorteil, dass mit einer einzigen Sonde der Nachweis möglich ist, dass DNA aus einer Gruppe von 35 (bzw.  $\geq 40$  bzw.  $\geq 45$  bzw. allen) HAdV-Serotypen in der zu untersuchenden Probe  
30 und damit auch in der klinischen Probe, aus der die zu untersuchende Probe gewonnen worden ist, vorhanden ist. Insbesondere kann die Sonde dazu verwendet werden, die amplifizierte DNA-Bereiche näher zu charakterisieren und sie damit von (ungewollt) mitamplifizierten DNA-Bereichen (wie z.B. aus Pseudogenen oder aufgrund schlechter Primerwahl) zu unterscheiden.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren betrifft einen Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
- 5 - Bereitstellen zumindest eines Primerpaares, das jeweils spezifisch an die DNA von zumindest 25 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
- Vermischen des zumindest einen Primerpaares mit der Probe,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung je eines der Primer an je einen der DNA-Stränge jedes einzelnen der besagten 25 HAdV-Typen ermöglichen,
- 10 - Amplifizieren der durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereiche jeder der in der Probe tatsächlich enthaltenen DNA der 25 HAdV-Serotypen,
- 15 - Detektieren amplifizierter DNA-Bereiche

Bevorzugt ist, dass das Primerpaar so ausgewählt ist, dass es nicht nur an die DNA von 25 sondern an die DNA von  $\geq 30$ , wiederum bevorzugt  $\geq 40$ , wiederum bevorzugt allen HAdV-Serotypen spezifisch binden kann.

- 20 Bevorzugt werden dabei als Primer erfindungsgemäße Nukleinsäuren verwendet, insbesondere solche mit der Sequenz der SEQ ID NO. 3 (oder dazu komplementäre) und ganz besonders bevorzugt Nukleinsäuren (a) der SEQ ID NO. 1 und/oder SEQ ID NO. 2 oder (b) einer Sequenz mit einer Homologie
- 25 > 78 % zu SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 2.

Die Amplifikation von DNA hierbei erfolgt regelmäßig über das PCR-Verfahren. Andere Verfahren zur in vitro Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen können auch angewendet werden.

- 30 Die Bedingungen, die eine spezifische Bindung der Primer an die entsprechenden DNA-Stränge ermöglichen, wird der Fachmann wiederum über die Variation geeignete Parameter, insbesondere die Temperatur, einstellen.

Die Detektion der amplifizierten DNA-Bereiche kann beispielsweise durch Auftrennung im Gel in einem Transilluminator, durch Konzentrationsbestimmung nach Umfällen (wodurch kurze DNA-Abschnitte und Einzel-Nukleotide aus der Probe entfernt wurden) oder aber auch durch Hybridisierung mit insbesondere 5 erfindungsgemäßen Sonden (siehe oben) erfolgen. Hinsichtlich weiterer Einzelheiten (z.B. Reihenfolge der Schritte, Häufigkeit der Einzelschritte, Vorbereitung der Proben) gilt das oben Gesagte entsprechend.

Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes eines bevorzugten erfindungsgemäßen 10 Primerpaares, liegt darin, dass dieses spezifisch an die DNA von 25,  $\geq 30$ ,  $\geq 40$ , oder sogar von allen HAdV-Serotypen binden kann. Dementsprechend müssen die Amplifikationsbedingungen für nur wenige Primerpaare – idealerweise nur für Eines – optimiert werden.

15 Je weniger Primer eingesetzt werden, desto genauer ist der Amplifikationsvorgang beherrschbar, da die jeweils relevante Primerkonzentration, die unter anderem Auswirkungen auf die Schmelztemperatur besitzt, besser zugänglich ist. Außerdem erschwert eine steigende Zahl von Primern die experimentelle Handhabbarkeit.

20 Der Einsatz von mehr als zwei ein erstes Primerpaar bildenden Primern erfolgt, wenn die DNA einer zweiten Gruppe HAdV-Serotypen amplifiziert und/oder nachgewiesen werden soll, an die ein oder beide Primer des ersten Primerpaares nicht spezifisch binden können. Der zusätzliche oder die zusätz- 25 lichen Primer müssen dann so gewählt werden, dass sie eine spezifische Bindung an die DNA der zweiten Gruppe HAdV-Serotypen unter Bedingungen eingehen, bei denen auch das erste Primerpaar spezifisch an die DNA bindet, an die es spezifisch binden kann.

30 Der Einsatz weiterer (entsprechend angepasster) Primer erfolgt auch dann, wenn stringenter Bedingungen, etwa solche, die weniger als vier Fehlpaarungen bei der Primerbindung zulassen, benötigt werden.

Das durch die erfindungsgemäßen Verfahren ermöglichte frühzeitige Nachweisen eines Befalls mit (wenigstens) einem Virus aus einer Gruppe von HAdV-Serotypen ist insbesondere für Patienten, die immundefizient oder – supprimiert sind, von ggf. lebenswichtiger Bedeutung.

5

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
- Bereitstellen zumindest eines Primerpaares, das jeweils spezifisch an  
10. die DNA von zumindest 15 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
- Bereitstellen einer Sonde, die jeweils spezifisch in den durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereichen an die DNA der gleichen zumindest 15 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
- 15 - Vermischen des zumindest einen Primerpaares mit der Probe,
- Vermischen der Sonde mit der Probe,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung je eines der Primer an je einen der DNA-Stränge jedes einzelnen der besagten 15 HAdV-Typen ermöglichen,
- 20 - Amplifizieren der durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereiche jeder der in der Probe tatsächlich enthaltenen DNA der 15 HAdV-Serotypen,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung der Sonde an Abschnitte der amplifizierten Bereiche ermöglichen,
- 25 - Detektieren amplifizierter DNA-Abschnitte, an die eine Sonde gebunden ist.

Dabei ist bevorzugt, dass das Primerpaar und die Sonde nicht nur an die DNA von 15 sondern von  $\geq 20$ , bevorzugt  $\geq 30$ , wiederum bevorzugt  $\geq 40$ , erneut  
30 bevorzugt  $\geq 45$  und schließlich bevorzugt allen HAdV-Serotypen spezifisch binden kann. Für Einzelheiten zu den genannten Schritten, vorteilhafte Primer und Sonden sowie sonstige bevorzugte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahrens gilt das bei den vorbeschriebenen Verfahren Erwähnte.

Ein besonderer Vorteil des gleichzeitigen Verwendens eines Primerpaares und einer Sonde, die jeweils spezifisch an die gleiche DNA der genannten Anzahl unterschiedlicher HAdV-Serotypen binden können, liegt darin, dass zum erfindungsgemäßen Nachweis von HAdV-DNA einer Vielzahl von Seroty-  
5 pen jeweils drei spezifische Bindungen notwendig sind und erzeugt werden. Dies erhöht die Zuverlässigkeit des Nachweisverfahrens erheblich gegenüber Verfahren mit nur zwei spezifischen Bindungen (PCR) oder solchen mit nur einer spezifischen Bindung (Nachweis per Sonde).

10 In bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren werden zum Amplifizieren keine degenerierten Primer verwendet. Der ausschließliche Einsatz nicht-degenerierter Primer bietet insbesondere den Vorteil, dass die Reaktion besser berechenbar ist. So kann man bei bekanntem Ziel-Bindungsabschnitt des nicht-degenerierten Primers das Bindungsverhalten, d.h. die Schmelztempera-  
15 tur sehr exakt berechnen. Demgegenüber besteht bei degenerierten Primern, wenn sie nach den üblichen Oligosyntheseverfahren hergestellt werden, das Problem, dass nicht klar ist, in welchem Verhältnis die tatsächlich vorhandenen Primervarianten vorliegen. Dabei beeinflusst die Konzentration jedes einzelnen Primers in einem degenerierten Primer die jeweilige Schmelztempera-  
20 tur, welche wiederum wichtig für die Anlagerung des einzelnen Primers an den Zielabschnitt der DNA ist. Das Verhältnis der Konzentrationen der tatsächlich in einem degenerierten Primer vorhandenen Primervarianten zueinander ist zudem von den genauen Herstellungsbedingungen abhängig, die wiederum bei unterschiedlichen Anbietern unterschiedlich sein können, so dass ein de-  
25 generierter Primer sich in seiner tatsächlichen Zusammensetzung nicht unwesentlich von dem von einem anderen Hersteller gelieferten „gleichen“ degenerierten Primer unterscheiden kann. Dies hat natürlich einen negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Nachweisverfahren. Außerdem kommt es bei mehreren nicht genau definierten Basen innerhalb des degenerierten Primers  
30 zu einer Vielzahl von möglichen Primer-Varianten, was für die einzelnen tatsächlich vorliegenden Primer bedeuten kann, dass sie in verhältnismäßig geringer Konzentration vorliegen und so für die ihnen entsprechende HAdV-DNA eine zu geringe Konzentration vortäuschen oder im Nachweis versagen können. Als weiteres Risiko besteht die Gefahr, dass bei einer größeren Zahl von

Primer-Varianten in einem degenerierten Primer einzelne Primer miteinander hybridisieren und somit für die PCR gar nicht mehr zur Verfügung stehen.

5 In bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren werden zum Amplifizieren weniger als 11, bevorzugt weniger als 5, wiederum bevorzugt weniger als 3 zu einander verschiedene Primer eingesetzt.

Die Verwendung einer nur geringen Zahl von Primern führt zu einer besseren Berechenbarkeit des gesamten Anlagerungs- und Amplifikationsprozesses, insbesondere dann, wenn die Zielsequenzen (die Bindungsabschnitte) auf der  
10 nachzuweisenden DNA bekannt sind. Des weiteren treffen die oben beschriebenen Nachteile degenerierter Primer für Primer im Sinne der hier gültigen Definition auch dann nicht zu, wenn mehrere Primer eingesetzt werden.

15 In bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren werden – wie erwähnt - erfindungsgemäße Nukleinsäuren als Primer (identisch mit oder abgeleitet von SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.2 oder SEQ ID NO. 3, vergleiche oben) zum Amplifizieren eingesetzt werden. Diese Primer erfüllen die Anforderung an Primer für die erfindungsgemäßen Verfahren in hervorragender Weise, insbesondere sind sie in der Lage, spezifisch an die DNA einer großen Zahl unterschiedlicher HAdV-Serotypen zu binden. Insbesondere für die PCR werden  
20 Primerpaare aus erfindungsgemäßen Desoxynukleinsäuren ausgewählt. Dabei fällt es dem Fachmann nicht schwer, unter Berücksichtigung der Syntheserichtung der DNA-Polymerase die jeweils sinnvolle Sequenz für einen Forward- und die entsprechende für einen Reversprimer zu bestimmen.

In bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren werden – wie erwähnt - erfindungsgemäße Nukleinsäuren (identisch mit oder abgeleitet von SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.2 oder SEQ ID NO. 3, vergleiche oben) als Sonden eingesetzt.  
30 Dabei ist es unter anderem abhängig von dem zu amplifizierenden DNA-Bereich, welche der SEQ ID NO. 1 bis 3 der Fachmann als bevorzugte Grundlage für die Sonde verwendet.

Besonders bevorzugt in diesem Zusammenhang sind RNA- oder DNA-  
35 Sonden, die von der SEQ ID NO. 3 abgeleitet wurden, weil dann bei Einsatz



von Primerpaaren, die von SEQ ID NO. 1 und 2 abgeleitet sind, der Sondenbindungsabschnitt im Amplikon liegt. Dabei ist es aufgrund der Tatsache, dass die beiden DNA-Stränge, die den Bindungsabschnitt umfassen, komplementär zueinander sind, nur von untergeordneter Bedeutung, ob die Sonde einer der  
5 oben beschriebenen Sequenzen entspricht, oder komplementär zu dieser ist.

Die genannten Sonden erfüllen die Anforderung an Sonden für die erfindungsgemäßen Verfahren in besonderer Weise, insbesondere sind sie in der Lage spezifisch an die DNA einer großen Zahl von HAdV-Serotypen zu binden.  
10

Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Verfahren so gestaltet, dass der amplifizierte Bereich (Amplikon)  $\leq 500$ , bevorzugt  $\leq 300$ , wiederum bevorzugt  $\leq 150$  Basenpaare umfasst.  
15

Vorteile eines Amplikons von geringer Größe bestehen im Vergleich mit größeren Amplikons insbesondere darin, dass die PCR schneller erfolgen kann, nur der Einsatz einer geringeren Menge an Nukleotiden notwendig und die Genauigkeit der DNA-Vervielfältigung erhöht ist.  
20

In besonders bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Detektion der amplifizierten DNA-Bereiche unter real time Bedingungen während und/oder nach einem, mehreren oder jedem Amplifikationsschritt.  
25

„Unter real time Bedingungen“ bedeutet hierbei, dass das Amplifikationsverfahren, das regelmäßig eine wiederholte Abfolge von mehreren Schritten umfasst (PCR) für die Detektion der amplifizierten DNA nicht unterbrochen werden muss. Dabei ist unter dem Terminus „nach jedem Amplifikationsschritt“  
30 nicht zu verstehen, dass unmittelbar nach Beendigung des Amplifikationsschrittes die Detektion erfolgen muss.

In bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren bindet eine Sonde für die in-Situ-Detektion spezifisch an Template-DNA und an in

den vorangehenden Amplifizierungsschritten vervielfältigte DNA der nachzuweisenden HAdV-Serotypen. Dies geschieht bevorzugt während des Primerbindungsschrittes (annealing) während der PCR. Dabei ist die Sonde so zu wählen, dass sie bei gleichen Bedingungen wie die Primer an die Ziel-DNA bindet. Bevorzugt ist dabei eine erfindungsgemäße, von der SEQ ID NO.3  
5 abgeleitete Nukleinsäure. Durch das Bindungsereignis kann dann eine Veränderung eines Signales z.B. die Verstärkung oder Abschwächung von Fluoreszenz ausgelöst und detektiert werden. Die Detektion kann aber auch aufgrund einer erst durch die Bindung der Sonde an ihren Zielabschnitt der DNA ermöglichten Reaktion wie z.B. dem Freisetzen eines Farbstoffes oder eines Quen-  
10 chers z.B. durch die Nuklease-Aktivität einer DNA-Polymerase erfolgen.

Ein so gestaltetes Verfahren bietet den Vorteil, dass arbeitsintensive und zeitverbrauchende Schritte für die Detektion des Amplikons wie z.B. Ethidium-  
15 Bromid gefärbte Gelelektrophorese mit oder ohne Restriktionsenzymverdau oder zusätzliche Hybridisierungsprozeduren nicht mehr notwendig sind.

Darüber hinaus verlangen Detektionsmethoden, die nicht unter real time Bedingungen durchgeführt werden, in der Regel ein offenes Hantieren mit PCR-  
20 Produkten, was ein hohes Risiko von Kontamination in sich birgt: Die äußerst empfindlichen PCR-Verfahren können im Extremfall bereits bei der Verschleppung von nur einem Molekül DNA in nachfolgende PCR-Ansätze zu falschen positiven Ergebnissen führen. Eine solche Verschleppung kann bereits durch die Luft erfolgen. Dementsprechend sind in Laboren die Sicherungsmaßnahmen gegen Kontamination umso aufwendiger, je mehr mit Nukleinsäuren of-  
25 fen hantiert werden muss.

Ein weiterer Vorteil der Detektion unter real time Bedingungen besteht darin, dass in Fällen, in denen es lediglich auf einen qualitativen Nachweis des Vorhandenseins von HAdV-DNA ankommt, die Amplifikationsprozedur ab dem  
30 Zeitpunkt abgebrochen werden kann, ab dem ein Signal vorliegt, das den Nachweis der entsprechenden DNA erbringt. Dies kann zu erheblicher Zeiteinsparung führen.

Darüber hinaus werden in vielen Nachweisverfahren hoch toxische und/oder krebserregende Reagenzien wie z.B. Ethidium-Bromid eingesetzt. Somit führt eine Detektion unter real time Bedingungen auch zu einem besseren Gesundheitsschutz des Laborpersonals. Zudem können auch Kosten für spezielle  
5 Schutzeinrichtungen wie z.B. Schutzkleidung gespart werden.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen der vorgeschilderten Verfahren erfolgt die Detektion der amplifizierten DNA-Bereiche quantitativ.

10 Für den relativen Vergleich detektierter DNA-Konzentrationen zueinander stehen dem Fachmann Methoden wie z.B. die Messung der UV-Transmission in einem Transilluminator nach der Trennung in einem Ethidium-Bromid gefärbten Gel oder auch densitometrische Auswertungen von Aufnahmen entsprechender Gele zur Verfügung.

15

Um Rückschlüsse auf die absolute DNA-Konzentration innerhalb einer Probe zu ermöglichen, können Signale, deren Stärke direkt abhängig von der DNA-Konzentration ist, auf Standardkurven bezogen und damit normalisiert werden. Für solche Verfahren eignen sich bevorzugt DNA-Nachweisverfahren, die  
20 Signale liefern, die mit hochauflösenden Geräten gemessen werden können. Die entsprechenden Signale können z.B. Sonden mit radioaktiver Markierung und besonders bevorzugt Sonden liefern, die abhängig von der Bindung an die DNA, gegebenenfalls nach weiteren Reaktionsschritten, Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Signale erzeugen.

25

Die Ergebnisse konventioneller PCRs sind nur qualitativ (positiv/negativ). Eine Quantifizierung von Adenovirus-DNA-Konzentrationen wird aber in der Forschung für das Verständnis der Kinetik und Pathophysiologie von Adenovirusinfektionen benötigt. Auch für grundlegende Erkenntnisse über die Viren selbst, wie z.B. Virusreplikation und Wirkmechanismen von Medikamenten ist  
30 eine Quantifizierung notwendig. Dieses Bedürfnis befriedigen die erfindungsgemäßen Verfahren in besonderer Weise, da – anders als bei den bisher bekannten quantitativen Verfahren für HAdV – nicht nur einer oder wenige, sondern eine größere Zahl von HAdV-Serotypen (in bevorzugten Verfahrensgestaltungen sogar alle) erfasst werden. Damit sind entsprechend gestaltete er-  
35

findungsgemäße Verfahren insbesondere für den Einsatz in klinischen Studien geeignet.

5 Bislang ist keine Therapiekontrolle bei der Behandlung von Adenovirus-Infektionen möglich (wie z.B. bei der Anwendung spezifischer Virostatika oder der Reduktion von immunsuppressiver Therapie). Auch dieses Problem wird durch quantitative erfindungsgemäße Detektionsverfahren gelöst, da diese in hochreproduzierbarer Weise die Quantifizierung der HAdV-Belastung von klinischen Proben nach deren geeigneter Vorbehandlung ermöglichen.

10

Nicht nur eine Therapiekontrolle, sondern auch die Entscheidung, eine Therapie einzuleiten wird durch die Quantifizierung erleichtert: Anders als bei den bisher bekannten ist es mit den erfindungsgemäßen Verfahren möglich, nicht nur die Tatsache der Belastung eines Patienten mit einem oder mehreren ei-  
15 ner großen Zahl von HAdV-Serotypen festzustellen, sondern über die Quantifizierung auch die Relevanz dieser Belastung. So wird ein Arzt insbesondere bei immunsupprimierten Patienten nur dann zu einer Abschwächung der Suppression raten, wenn die Virusbelastung eine ernsthafte Gefahr für den Patienten ist oder zu werden droht. Letztendlich ist über die Quantifizierung, ins-  
20 besondere wenn sie für Proben des selben Patienten durchgeführt wird, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen wurden, eine Vorhersage des tatsächlichen Ausbruches von auf HAdV beruhenden Krankheiten erleichtert.

25 Die erfindungsgemäßen Verfahren ermöglichen darüber hinaus die (notwendige) Quantifizierung von humanen Adenoviren für die Planung und Kontrolle von Gentherapien mit Adenovirus-Vektoren.

Gemäß einer weiteren, besonders bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren werden als Primer erfindungsgemäße Nukleinsäuren, die  
30 wie oben beschrieben homolog zu den Sequenzen SEQ ID NO. 1 und/oder SEQ ID NO. 2 sind und/oder als Sonde eine erfindungsgemäße markierte Nukleinsäure, die wie oben beschrieben der Sequenz SEQ ID NO. 3 homolog oder zu einer solchen homologen komplementär ist, verwendet.

Der Vorteil des Einsatzes der genannten Primer und/oder der genannten Sonden besteht darin, dass es sich dabei um Primer und Sonden handelt, die an die DNA einer Vielzahl von HAdV-Serotypen binden können. Auch die anderen oben genannten Vorteile der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kommen  
5 beim Einsatz in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Quantifizierung zum Tragen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der beschriebenen Erfindung werden dabei aus den genannten Gründen als Primer(paar) Nukleinsäuren mit der SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 und eine Sonde eine markierte  
10 Nukleinsäure mit der SEQ ID NO. 3 oder einer dazu komplementären Sequenz verwendet.

Die Verwendung der bevorzugten Primer und Sonden führt dazu, dass zuverlässig die DNA aller HAdV-Serotypen in klinischen Proben nachgewiesen werden kann. Dabei ermöglichen erfindungsgemäße Verfahren wie aufgeführt  
15 auch die Quantifizierung – sogar unter real time Bedingungen – der in der Probe enthaltenen HAdV-DNA. Trotz des Bedarfs an solchen Verfahren für die Detektion von HAdV war es der Fachwelt aufgrund der hohen Sequenzdiversität dieser Viren nicht gelungen, ein solches zu erstellen.  
20

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren (ggf. in ihren bevorzugten Ausgestaltungen) wird ein TaqMan PCR-Verfahren (auch als „exonuclease probe“ Verfahren bezeichnet) zur  
25 Amplifikation und Detektion verwendet (vergleiche Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-80; und Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-94; sowie Kricka, L. J. (2002): Stains, labels  
30 and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann Clin Biochem* 39, 114-29).

Bislang wurden eine Reihe, (zum Teil generische) TaqMan PCR-Verfahren für  
35 verschiedene humane patogene Viren beschrieben. Diese Verfahren zeichnen

sich durch eine Reihe von Vorteilen aus. Eine Übertragung dieses Prinzips auf den (gleichzeitigen) Nachweis einer großen Zahl von HAdV-Serotypen war allerdings bislang aufgrund der geschilderten Sequenzdiversität dieser Viren noch nicht gelungen, ist aber mit den Erkenntnissen der vorliegenden Erfindung jetzt möglich geworden.

Die Sonde kann dabei auf verschiedene Weise markiert werden, beispielsweise mit FAM als Fluoreszenzfarbstoff am 5'Ende und TAMRA als Fluoreszenzquencher am 3'Ende. Dies führt zu einer Quenchung der Fluoreszenz des Farbstoffes der Sonde im ungebundenen Zustand und zu einer Freisetzung der Fluoreszenz im gebundenen Zustand z.B. durch die Trennung des Reporter- und des Quencherfarbstoffes durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase während des Verlängerungsschrittes in der PCR.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden hierbei eine Sonde der SEQ ID NO. 3 und Primer der SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 verwendet.

Ein als TaqMan PCR-Verfahren ausgestaltetes erfindungsgemäßes Verfahren vereint bei der entsprechenden Wahl der Primer alle zu den erfindungsgemäßen Verfahren und deren bevorzugten Ausgestaltungen aufgezählten Vorteilen in sich:

- Die Detektion der amplifizierten DNA erfolgt unter real time Bedingungen während der PCR durch Hybridisierung der DNA mit einer Sonde.
- Arbeits- und zeitaufwendige nachfolgende Detektionsschritte sind nicht mehr notwendig.
- Gute Handhabbarkeit
- Eine Kontamination nachfolgender PCR-Ansätze durch amplifizierte DNA ist durch das TaqMan-Prinzip so gut wie ausgeschlossen, da kein offenes Hantieren mit PCR-Produkten notwendig ist.
- Bei einer geeigneten, erfindungsgemäßen Wahl der Primer und der Sonde ermöglicht das TaqMan PCR-Verfahren den Nachweis sämtlicher bekannter Serotypen der HAdV.
- Eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen HAdV-DNA ist mit dem TaqMan Verfahren zuverlässig möglich.

Darüber hinaus stellt das TaqMan PCR-System ein etabliertes Verfahren dar, für das die benötigten Komponenten (Geräte, Chemikalien) kommerziell erhältlich sind und zu dem es entsprechenden Optimierungssupport gibt.  
5 Insbesondere ist das quantitative Auswertungsverfahren (Analyse über die Crossing-Points, CP) gut etabliert.

Als weiterer Vorteil ist die gegenüber den konventionellen PCR-Verfahren höhere Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen TaqMan-Verfahrens zu nennen.  
10 Die Nachweisgrenze liegt dabei je nach Ausgestaltung des Verfahrens bei  $\leq 1,5 \times 10^4$ , bevorzugt  $\leq 1,5 \times 10^3$ , wiederum bevorzugt  $\leq 1,5 \times 10^2$ , und schließlich bevorzugt  $\leq 1,5 \times 10^1$  Template-Molekülen pro Ansatz (vergleiche dazu auch Tabelle 1).

15 Gemäß weiteren bevorzugten Ausgestaltungen der beschriebenen Verfahren erfolgt die Primer-Bindung (annealing) bei  $\geq 48^\circ\text{C}$ , bevorzugt bei  $\geq 50^\circ\text{C}$ , weiter bevorzugt bei  $\geq 53^\circ\text{C}$ , wiederum bevorzugt bei  $\geq 55^\circ\text{C}$ .

Eine hohe (höhere) Temperatur in der annealing-Phase bietet den Vorteil,  
20 dass die Primer-Bindung mit hoher (höherer) Sicherheit tatsächlich spezifisch ist.

Die Erfindung umfasst auch ein Kit, umfassend Primerpaar und Sonde, jeweils bestehend aus erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

25 Ein wesentlicher Vorteil eines solchen Kits besteht darin, dass Primer und Sonde optimal auf einander abgestimmt sind und die Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren in ihren besonders bevorzugten Ausgestaltungen ermöglichen.

30 Ebenfalls erfindungsgemäß ist die Verwendung einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Nukleinsäuren oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis von HAdV-DNA. Dies geschieht vorzugsweise im Rahmen eines der vorbeschriebenen Verfahren. Die so – wie auch durch die vorgeschriebenen

Verfahren – erhaltenen Ergebnisse können sodann als Grundlage für eine Diagnose durch den Arzt dienen.

5 Damit sind dem Arzt Daten in die Hand gegeben, die es ihm ermöglichen, fundierte Entscheidungen über die Notwendigkeit und die Art von Therapieanwendungen bezüglich der HAdV zu treffen.

Die Erfindung umfasst auch ein Verfahren zum Charakterisieren von HAdV-Serotypen mit folgenden Schritten:

- 10
- Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe gemäß einem der vorbeschriebenen Verfahren
  - Charakterisieren in der Probe nachgewiesener HAdV-DNA

15 Zum Charakterisieren nachgewiesener HAdV-DNA stehen dem Fachmann eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung. So kann er z.B. über Restriktions-Fragment-Analyse, insbesondere aber durch vollständiges - oder Ansequenzieren der in der Probe enthaltenen DNA, diese einer der sechs humanen Adenovirus-Spezies oder sogar einem bekannten HAdV-Serotypen zuordnen.

20 Eine Vorgehensweise ist die unten beschriebene molekulare Charakterisierung von PCR-positiven Proben durch Multiplex PCR und Sequenzierung (vergleiche Beispiel 4).

25 Für den Fall, dass die DNA von mehr als einem HAdV-Serotypen in der zu untersuchenden Probe enthalten ist bzw. war, kann es notwendig sein, umfassendere Charakterisierungen vorzunehmen, insbesondere um die Resultate der Charakterisierungsschritte den jeweiligen HAdV-Serotypen zuordnen zu können. Dazu kann der Fachmann beispielsweise Serotyp-spezifische Primer  
30 in einer weiteren PCR einsetzen.

Vorteil des geschilderten Verfahrens ist, dass damit nicht nur grundsätzlich die Anwesenheit von HAdV nachgewiesen wird, sondern durch die nachfolgende Charakterisierung auch bestimmt wird, welcher oder welche einzelnen Seroty-  
35 pen tatsächlich vorliegen.



Durch das genannte Verfahren ist es auch möglich, bisher unbekannte HAdV-Serotypen zu identifizieren, da die erfindungsgemäßen Verfahren auch die DNA unbekannter HAdV-Serotypen erfassen und damit zur Entdeckung dieser Serotypen verwendet werden können: Falls sich der amplifizierte oder die amplifizierten DNA-Bereiche nicht einzelnen schon bekannten HAdV-Serotypen zuordnen lassen (z.B. durch Datenbankvergleich nach Sequenzierung), so ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein bislang unbekannter HAdV-Serotyp vorliegt, sehr hoch (wenn es sich nicht um einen bereits bekannten Serotypen handelt, dessen dem charakterisierten DNA-Bereich korrespondierende Basensequenz noch nicht in den Gendatenbanken zu finden ist). Weitere Charakterisierungen anderer DNA-Bereiche, bzw. bevorzugt des potentiellen Virus selbst, können gegebenenfalls die Erkenntnis verifizieren, dass ein neuer HAdV-Serotyp gefunden wurde.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Proben mit einem erfindungsgemäßen Verfahren auf die Anwesenheit von HAdV-DNA zu screenen und dann bei den positiven Proben eine Virusisolation und Typisierung mit konventionellen Techniken vorzunehmen wie z.B. Isolation auf Zellkulturen und im positiven Fall anschließende Typisierung durch Neutralisationstests, Hämagglutinationstests und Hämagglutinationsinhibitionstests. Neue Typen würden sich mit diesen konventionellen Techniken nicht zufriedenstellend typisieren lassen und deshalb als neues, nicht typisierbares Adenovirus erscheinen.

Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung werden nachfolgend anhand der Figuren und der Beispiele näher erläutert.

Fig. 1 stellt das multiple Alignment eines Teils der Hexon-Gensequenzen verschiedener HAdV-Serotypen und die Konsensus-Sequenzen der PCR-Primer (AQ1, SEQ ID NO. 1; AQ2, SEQ ID NO. 2) und der Sonde AP (SEQ ID NO. 3) dar. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$  der Bindung von AQ1 und AQ2 sowie AP) an jede Sequenz wurden unter Berücksichtigung der Fehlpaarungen (mismatches) zwischen der Konsensussequenz und der jeweiligen HAdV-Sequenz ermittelt. Die Basennummerierung erfolgte aufgrund der HAdV-2-Sequenz. Die Datenbanknummern sind: HAdV-2 (#NC 001405), HAdV-3 (#X76549),

HAdV-4 (#AF06062), HAdV-5 (#NC 00146), HAdV-12 (#AF065065), HAdV-34 (#AB052911), HAdV-40 (#L19443), HAdV-41 (#M21163).

Fig. 2 stellt den Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Zyklen-Zahl dar. Drei unterschiedliche Template-Konzentrationen (A, B:  $1,5 \times 10^7$  Kopien pro Lauf; C, D:  $1,5 \times 10^4$  Kopien pro Lauf; E, F:  $1,5 \times 10^1$  Kopien pro Lauf) wurden getestet mit (B, D, F) und ohne 500 ng humaner DNA (A, C, E). Der Fluoreszenzanstieg über den Schwellenwert (Crossing Point, CP) wurde anders als die End-Fluoreszenz nicht durch die humane DNA beeinflusst.

10

Beispiel 1: HAdV-Quantifizierung, Standardplasmid und zur Verfügung stehende Viren

Zur Präparation eines Standards für die Positiv-Kontrollen wurde ein HAdV-2-PCR-Amplikon (nt. 18856-19137 der HAdV-2-Sequenz) in einen pGEM-T Easy plasmid vector (Promega, Madison, WI) einkloniert. Die Plasmid-DNA wurde aus E.coli unter Verwendung des Nukleobond 100 Kit (Macherey und Nagel, Deutschland) aufgereinigt und durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass die klonierte HAdV-2-Sequenz identisch mit der HAdV-2-Prototyp-Genbanksequenz (#J01917) war. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und in Genom-Äquivalenten (Kopien pro ml) umgerechnet, da das Molekulargewicht des Plamides bekannt war.

Für die Testreihe der HAdV-Serotypen wurden A549-Zellen (im Fall von HAdV-40 und HAdV-41 Graham 293-Zellen) mit den HAdV-Prototypstämmen infiziert. Bei über 50 % CPE (zytopathischer Effekt) wurden die Zellen gefriergetaut und die DNA aus 200 µl des Lysates mit dem Qiagen Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Prototypvirusstämme des Deutschen Nationalreferenz-Laboratoriums (Typen HAdV-1 bis -21, -23, -25, -27, -28, -30 bis -41, -43) und der American Type Culture Collection (Manassas, VA) (HAdV-3, -5, -7, -12, -18, -22, -24, -26, -29, -30, -35, -36, -42, -44 bis -49 und der vorgeschlagenen Typen -50 und -51) wurden getestet.

### Beispiel 2: Design von Primern und Sonde

Ein Primerpaar für die Amplifikation der DNA aller 51 Serotypen des Genus HAdV wurde folgendermaßen entworfen: Fünf, bislang vollständig sequenzier-  
5 te HAdV, Typ 2 (Spezies (Genus) humaner Adenovirus C, Genbank #J01917),  
5 (Spezies humaner Adenovirus C, #M73260), 12 (Spezies humaner Adenovi-  
rus A; #X73487), 17 (Spezies humaner Adenovirus D, #AF108105), and 40  
(Spezies humaner Adenovirus F, Genbank #L19443) wurden unter Verwen-  
dung der clustalX Software (Version 1.8) in ein Alignment gebracht (vergleiche  
10 Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: impro-  
ving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through se-  
quence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.  
Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80).

15 Mehrere hochkonservierte Regionen, die nicht nur die spezifische Anlagerung  
der Primer sondern auch der markierten Sonde ermöglichen, wurden im He-  
xon-Gen identifiziert. Da zusätzliche Daten über die Hexon-Gensequenz ver-  
schiedener HAdV-Typen verfügbar sind, wurde ein multiples Alignment des  
Hexon-Genes unter Einschluss von Sequenzen aller sechs HAdV-Generi er-  
20 zeugt und für die Primererstellung verwendet (vergleiche Fig. 1). Die Primer  
wurden gemäß den Richtlinien für TaqMan PCR (vergleiche: Sequence detec-  
tion systems quantitative assay design and optimization; www.appliedbiosys-  
tems.com, application note #77101-006) so ausgewählt, dass der von ihnen  
begrenzte Bereich einen dritten hochkonservierten Abschnitt umfasst, der als  
25 Bindungsstelle für die Sonde dienen kann.

Trotz der Selektion konservierter Regionen gibt es kleinere Sequenzdiversitä-  
ten in den Bindungsabschnitten der Primer und der Sonde. Um die maximale  
Zahl der Fehlpaarungen auszugleichen, wurden die Konsensus-  
30 Primersequenzen durch Berechnung der Schmelztemperaturen der Interaktion  
beider Primer mit jeder HAdV-DNA-Sequenz mit der Hilfe der Metcalc Soft-  
ware (vergleiche: Schütz, E., and N. von Ahsen. 1999. Spreadsheet software  
for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization  
with and without mismatches. Biotechniques. 27:1218-24.) entworfen (verglei-  
35 che Fig. 1).

Eine Amplifikationsreihe in einer konventionellen PCR für die DNA von 51 HAdV, die alle Serotypen (einschließlich der vorgeschlagenen Typen 50 und 51) einschloss, zeigte, dass das Primerpaar (AQ1 und AQ2) in der Lage war, 5 DNA-Bereiche aller humanen Adenoviren zu amplifizieren.

Gegenüber der konventionellen PCR benötigt die Real-Time-Detektion der PCR-Amplikons mit einer TaqMan-Sonde die fast vollständige Hybridisierung einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, um den Abbau der Sonde durch 10 die Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zu erreichen. Die Sonde wurde nach den Richtlinien für TaqMan-Sonden (vergleiche: Sequence detection systems quantitative assay design and optimization; [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com), application note #77101-006) erstellt und die Zahl von Fehlpaarungen bei der Bindung an die DNA jedes HAdV-Serotypes des multiplen Alignments wurde auf ähnlichem Wege wie bei den Primern minimiert (vergleiche Fig. 1). Die  $T_m$  der Sonde und der Primer für die Hybridisierung mit der entsprechenden Sequenz der DNA jedes HAdV-Serotypen wurde berechnet und die Reaktionsbedingungen der Real time PCR wurden so eingestellt, dass 15 die Amplifikation und Detektion möglichst aller humanen pathogenen Adenoviren ermöglicht wurde (vergleiche Beispiel 3). 20

### Beispiel 3: Durchführung der TaqMan PCR

Die TaqMan PCR wurde mit Hilfe des LightCycler (LC, Roche Diagnostics, 25 Mannheim, Deutschland) in verschlossenen Glaskapillaren mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Das FastStart Hybridization Kit (Roche) wurde für die Erstellung eines PCR-Mastermixes verwendet. Als HAdV-spezifische Primer wurden Primer Adenoquant 1 (AQ1, SEQ ID NO. 1) und Adenoquant 2 (AQ2, SEQ ID NO. 2) verwendet. Die Sonde (AP, SEQ ID NO. 30 3) wurde mit FAM (Carboxyfluorescein) als Fluoreszenzfarbstoff am 5'Ende und TAMRA (Carboxytetramethylrhodamin) als Fluoreszenz-Quencher am 3'Ende markiert. Alle Oligonukleotide wurden synthetisiert, markiert und gereinigt durch Eurogentec (Seraing, Belgien). Die Sonde, die Primer und Magnesiumchlorid wurden so zum Mastermix hinzugefügt, dass die Endkonzentrationen der Sonde 0,4 mM, jedes Primers 0,5 mM und von Magnesiumchlorid 3 35

mM betrug. Darüber hinaus wurde hitzelabile Uracil-DNA Glycosylase (UNG, 1 U/Reaktion; Roche, Mannheim, Deutschland) dem Mastermix hinzugefügt. 8 µl des Mastermixes und 12 µl der DNA-Templatelösung wurden in jede Kapillare gefüllt. Die verschlossenen Kapillaren wurden in einer Mikrozentrifuge zentriert und in den LC platziert.

Die Reaktionsbedingungen waren folgendermaßen: 5 Minuten bei 35 °C für die Uracil-DNA-Glycosylase-Inkubation, gefolgt von 10 Minuten bei 95 °C, um die „hot start“ Taq-Polymerase zu aktivieren. 45 Zyklen, die aus dem Denaturierungsschritt (denaturation) bei 95 °C für 3 Sekunden, dem Anlagerungsschritt (annealing) bei 55 °C für 10 Sekunden und dem Verlängerungsschritt (extension) bei 65 °C für 60 Sekunden bestanden, wurden durchgeführt. Die Temperatursteigerungsgeschwindigkeit zwischen dem Anlagerungs- und dem Verlängerungsschritt betrug 0,5 °C pro Sekunde.

Die Fluoreszenzdaten wurden am Ende jeden Verlängerungsschrittes im Kanal F1 (Aufnahmeart „single“) der LC-Apparatur aufgenommen. Der Crossing Point (CP), die Zyklenzahl, die mit dem Anstieg der Fluoreszenz über einen Schwellenwert korrespondiert, wurde automatisch durch die LightCycler Software (Version 3.5c, Einstellung: proportionale Basislinienabgleichung, Schwellenwert = Basislinie + 6 SD der Basislinie, Sollwertberechnung mit zwei Punkten) berechnet. Nach dem letzten Zyklus wurden die Röhrchen auf 30 °C heruntergekühlt und entsorgt, ohne die Kapillaren zu öffnen.

#### *Nachweis der HAdV-Serotypen mit der TaqMan PCR:*

Die Real time PCR (TaqMan PCR) ergab positive Ergebnisse für alle Prototypen-Stämme des Genus HAdV, einschließlich der kürzlich isolierten und vorgeschlagenen neuen Typen HAdV-50 und HAdV-51. Dabei waren die Crossing Point (CP) Werte von < 20 für alle Prototypen-Stämme gering, was eine effektive Amplifikation und eine sensitive Detektion indiziert. Darüber hinaus wurden zwölf klinische Isolierungen von HAdV unterschiedlicher Serotypen durch die TaqMan PCR getestet und alle Isolierungen waren mit geringen CP-Werten (< 20) positiv. Demgegenüber war die Real time PCR mit 100 ng hu-

maner DNA, die aus Zellkulturen (MRC5) oder aus dem Blut eines gesunden Erwachsenen als Template isoliert worden waren, stets negativ ( $n = 38$ ).

*Sensitivität und dynamischer Bereich der Quantifikation:*

5

Eine Plasmid-DNA, die eine Teilsequenz des HAdV-2-Hexon-Gens enthielt, wurde serienverdünnt und als Template für das PCR-Verfahren ( $1,5 \times 10^8$  bis  $1,5 \times 10^{-1}$  HAdV-2-Genom-Äquivalente (Kopien) pro Ansatz) in je zehn wiederholten Ansätzen zur Untersuchung der Sensitivität der TaqMan PCR eingesetzt. Eine so geringe Zahl wie  $1,5 \times 10^1$  Kopien wurden zuverlässig nachgewiesen ( $n = 10$ ), während  $1,5 \times 10^0$  Kopien nur noch gelegentlich detektiert werden konnte (4 von 10 Ansätzen) und höhere Verdünnungen waren negativ, ebenso wie die Negativ-Kontrollen, die nur destilliertes Wasser enthielten (vergleiche Tabelle 1).

15

Tabelle 1

| Genom-Äquivalente    | Anteil positiver Nachweise | (mittlerer) Crossing Point | SD-% | Berechnete (mittlere) Konzentration | SD %  |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|------|-------------------------------------|-------|
| $1,5 \times 10^8$    | 10/10                      | 15,47                      | 4,30 | $1,91\text{E}+08$                   | 15,66 |
| $1,5 \times 10^7$    | 10/10                      | 19,27                      | 4,09 | $1,56\text{E}+07$                   | 13,88 |
| $1,5 \times 10^6$    | 10/10                      | 22,96                      | 3,07 | $1,39\text{E}+06$                   | 15,58 |
| $1,5 \times 10^5$    | 10/10                      | 26,59                      | 2,27 | $1,26\text{E}+05$                   | 11,25 |
| $1,5 \times 10^4$    | 10/10                      | 29,93                      | 2,03 | $1,47\text{E}+04$                   | 32,73 |
| $1,5 \times 10^3$    | 10/10                      | 33,37                      | 1,77 | $1,49\text{E}+03$                   | 28,13 |
| $1,5 \times 10^2$    | 10/10                      | 37,23                      | 2,03 | $1,22\text{E}+02$                   | 35,13 |
| $1,5 \times 10^1$    | 10/10                      | 39,63                      | 2,97 | $2,43\text{E}+01$                   | 49,95 |
| $1,5 \times 10^0$    | 4/10                       | > 41                       | nd   | nd                                  | nd    |
| $1,5 \times 10^{-1}$ | 0/10                       | nd                         | nd   | nd                                  | nd    |

Tabelle 1: Versuchsvariabilität der HAdV TaqMan PCR, bestimmt durch verschiedene Ansätze an verschiedenen Tagen  
nd: nicht bestimmt

20

Die Serienverdünnung der Plasmid-DNA wurde auch zur Bestimmung des dynamischen Bereiches der Quantifikation verwendet. Die Versuchsvariabilität (Standardabweichung der CP-Werte) war gering, z.B. 2,7 % für  $1,5 \times 10^7$  Kopien pro Ansatz und 1,1 % für  $1,5 \times 10^4$  Kopien pro Ansatz. Tabelle 1 gibt die Durchschnitts-CP und die Standardabweichung (SD) der in zehn verschiedenen Ansätzen an verschiedenen Tagen ermittelten CP wieder. Die Regressionsanalyse der Crossing Points gegen log HAdV-DNA-Konzentration ergab einen sehr hohen Korrelations-Koeffizienten (0,99 bis 1,0) für den Konzentrationsbereich zwischen  $1,5 \times 10^1$  bis  $1,5 \times 10^8$  Kopien HAdV-DNA pro Ansatz. Die daraus resultierenden Regressionsgraden ( $n = 10$ ) hatten ein Gefälle von  $-3,5$  ( $SD = 0,075$ ), was auf eine effektive Amplifikation der Adenovirus DNA der Probe hinwies (Verfielfältigung der DNA um den Faktor 1,93 pro Zyklus).

In weiteren Experimenten wurden die HAdV-DNA-Konzentrationen der Serienverdünnung des Plasmides als Standard gesetzt und HAdV-DNA-Konzentrationen jedes Punktes automatisch durch die LC-Software (Version 3.5c) unter der Annahme einer semilogarithmischen Relation zwischen den Crossing Points und der HAdV-DNA-Konzentration berechnet. Berechnete HAdV-DNA-Konzentration und SD von berechneten Konzentrationen weisen auf einen dynamischen Bereich der HAdV-DNA-Quantifikation von wenigstens sechs Größenordnungen ( $1,5 \times 10^8$  bis  $1,5 \times 10^2$  Kopien HAdV-DNA), hin, niedrige Virus-DNA-Konzentrationen wie  $1,5 \times 10^1$  Kopien können ebenfalls quantifiziert werden, allerdings mit einer höheren Standardabweichung (vergleiche Tabelle 1).

Das Versetzen der Serienverdünnung des HAdV-Templates mit humaner genomischer DNA (500 ng pro Ansatz) beeinflusste nicht die Sensitivität und Quantifikation des HAdV-DNA-Nachweises, da der Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert (CP-Wert) durch die hDNA unbeeinflusst war (vergleiche Fig. 2). Anders als die CP-Werte weisen die Endpunkt-Fluoreszenzdaten auf negativen Einfluss von 500 ng humaner DNA auf die Amplifikation von HAdV-DNA (vergleiche Fig. 2).

Beispiel 4: Charakterisierung von in den Proben enthaltenen HAdV-DNA durch molekulares Typisieren

Eine Multiplex-PCR, die die Fiber-Gen-Region amplifiziert, wurde mit positiven  
5 HAdV-DNA-Proben (nach dem im Beispiel 3 geschilderte TaqMan Verfahren) durchgeführt, um eine Identifikation des jeweiligen HAdV-Serotypen zu ermöglichen (vergleiche: Xu, W., M. C. McDonough, and D. D. Erdman. 2000. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 38(11):4114-20). Zusätzlich wurden Amplikons direkt mit Rhodaminmarkierten Didesoxynukleotid-Kettenterminatoren (DNA Sequencing Kit,  
10 ABI, Foster City, CA) auf einem ABI-Prism 310 automatic sequencer sequenziert.

Sowohl die Amplifikation des Hexon-Genes (vergleiche: Allard, A., B. Albins-  
15 son, and G. Wadell. 1992. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. J Med Virol. 37(2):149-57; Xu, W., M. C. McDonough, and D. D. Erdman. 2000. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 38(11):4114-20) als auch das Sequenzieren ermöglichen die  
20 Identifikation des HAdV-Serotypen, in einigen Fällen unter Verwendung von BLAST- und FASTA-Programmen, wenn hinreichende Sequenzdaten in Gen-datenbanken zur Verfügung stehen. Da die Hexon-Gen-Regionen vieler HAdV-Serotypen noch nicht sequenziert wurden, ermöglicht deren Sequenzierung zwar nicht die Identifikation dieser HAdV-Serotypen, aber durch multiple  
25 Alignments mit Datenbanksequenzen und Clustering-Identifikation wird die Identifizierung leicht auf der Ebene des Genus (Spezies) ermöglicht.

Mit den genannten Verfahren (TaqMan PCR, Charakterisierung/Typisierung) konnten aus klinischen Proben eine Vielzahl von HAdV-Serotypen identifiziert  
30 werden, ohne dass eine Virusisolierung notwendig gewesen wäre. Dazu gehörten unter anderem HAdV der Serotypen 1, 3, 4, 5, 7, 37, 40, 41 und verschiedene Viren des Genus HAdV-D einschließlich eines Serotypes, der bisher noch nicht sequenziert worden ist.



### Beispiel 5: Vergleich des TaqMan PCR Verfahrens mit konventionellen PCR Verfahren

234 Patientenproben wurden unter Verwendung von TaqMan (vergleiche Beispiel 3) und konventionellen PCR-Protokollen untersucht. Nach der DNA-Extraktion aus den Proben wurde das DNA enthaltende Eluat für die konventionelle und die TaqMan PCR geteilt. Das konventionelle Adenovirus-PCR-Protokoll wurde mit den generischen Primern hex1deg und hex2deg sowie Amplifikationsbedingungen wie in Allard, A., B. Albinsson, and G. Wadell. 1992. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 37(2):149-57 und Wadell, G., A. Allard, and H. Hierholzer. 1999. Adenovirus, p. 970-981. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, C. A. Tenover, and R. A. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. beschrieben durchgeführt. Das Protokoll wurde leicht durch Verwendung eines fertigen Mastermixes mit „hot start“-DNA-Polymerase (Qiagen HotStarTaq Master Mix) modifiziert.

Zusätzlich wurden alle Proben mit von TaqMan zu konventioneller PCR verschiedenen Resultaten mit einem weiteren konventionellen PCR-Verfahren unter Verwendung der generischen Adenovirus-Primer Ad-1 und Ad-2 wie in Xu, W., M. C. McDonough, and D. D. Erdman. 2000. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 38(11):4114-20 beschrieben überprüft. Nach der Amplifikation wurde eine Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte (10 µl) auf 2 %igen Agarose-Gelen durchgeführt, die mit Ethidium-Bromid gefärbt wurden. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte durch UV-Illumination.

Die 234 klinischen Proben waren EDTA-Blut (58), Serum und Plasma (60), Rachenabstriche und/oder -spülungen (21), kombinierte Nasopharyngale Abstriche (5), Augenabstriche (17), cerebrospinale Flüssigkeit (26), Stuhl (22), Bronchoalveoläre Spülungen und Luftröhrenaspirate (12), sowie 13 andere Materialien, z.B. pericardiale, pleurale und peritoneale Flüssigkeiten, Urin und Biopsien von Lymphknoten und Darm (13).

Bei 200 Proben stimmten die Ergebnisse von konventioneller PCR und TaqMan PCR überein (38 positive Proben und 162 negative Proben). 34 Proben hatten unterschiedliche Ergebnisse zwischen beiden Versuchsansätzen. In den 33 dieser Proben war die TaqMan PCR positiv mit hohen CP-Werten (CP > 37, was näherungsweise weniger als 150 Kopien HAdV-DNA pro Ansatz bedeutet), während die konventionelle PCR negativ war. Dies zeigt, dass das TaqMan PCR-Verfahren verglichen mit dem beschriebenen konventionellen PCR-Verfahren eine höhere Sensitivität aufweist.

- 10 Nur eine einzige Probe (EDTA-Blut) war im konventionellen PCR-Verfahren positiv (dünne Bande auf dem Agarose-Gel) und negativ im TaqMan PCR-Verfahren. Dieses positive Resultat wurde durch Multiplex-PCR bestätigt und der Virus stellte sich als ein Virus des Genus HAdV-D heraus. Damit wies das beschriebene TaqMan PCR-Verfahren in 70 von 71 positiven Proben die
- 15 HAdV-DNA nach, während dies mit der konventionellen PCR nur in 38 der 71 Proben gelang.

Dabei konnten mit dem TaqMan PCR-Verfahren aus allen Probematerialtypen einzelne Proben als positiv nachgewiesen werden, bei den „anderen Materialien“ allerdings nur in Proben aus Lymphknotenbiopsie und aus Peritonealflüssigkeit (jeweils eine positive Probe). Letzteres heißt aber nicht, dass ein Nachweis aus den anderen Probearten nicht grundsätzlich möglich wäre.

Ansprüche

1. Markierte oder unmarkierte Nukleinsäure zum spezifischen Binden an DNA humaner Adenoviren (HAdV-DNA), wobei die Nukleinsäure
  - 5 a) die Sequenz SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt,
  - b) eine Sequenz mit einer Homologie von mehr als 78% zu SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 3 besitzt oder
  - c) komplementär zu einer Nukleinsäure nach a) oder b) ist.
- 10 2. Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:
  - Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
  - Bereitstellen einer Sonde, die jeweils spezifisch an die DNA von zu-
  - 15 - mindest 35 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
  - Vermischen der Sonde mit der Probe,
  - Amplifizieren von Bereichen jeder der in der Probe tatsächlich enthal-
  - tenen DNA der 35 HAdV-Serotypen, so dass der Abschnitt, an den die
  - genannte Sonde spezifisch binden kann, mit amplifiziert wird,
  - Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung der Sonde
  - 20 an Abschnitte der amplifizierten Bereiche ermöglichen,
  - Detektieren amplifizierter DNA-Abschnitte, an die eine Sonde gebun-
  - den ist.
- 25 3. Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:
  - Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
  - Bereitstellen zumindest eines Primerpaares, das jeweils spezifisch an
  - die DNA von zumindest 25 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden
  - kann,
  - 30 - Vermischen des zumindest einen Primerpaares mit der Probe,
  - Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung je eines der
  - Primer an je einen der DNA-Stränge jedes einzelnen der besagten 25
  - HAdV-Typen ermöglichen,

- Amplifizieren der durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereiche jeder der in der Probe tatsächlich enthaltenen DNA der 25 HAdV-Serotypen,
- Detektieren amplifizierter DNA-Bereiche.

5

4. Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Probe, die potentiell HAdV-DNA enthält,
- Bereitstellen zumindest eines Primerpaars, das jeweils spezifisch an  
10 die DNA von zumindest 15 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden kann,
- Bereitstellen einer Sonde, die jeweils spezifisch in den durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereichen an die DNA von den gleichen zumindest 15 unterschiedlichen HAdV-Serotypen binden  
15 kann,
- Vermischen des zumindest einen Primerpaares mit der Probe,
- Vermischen der Sonde mit der Probe,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung je eines der Primer an je einen der DNA-Stränge jedes einzelnen der besagten 15  
20 HAdV-Typen ermöglichen,
- Amplifizieren der durch das zumindest eine Primerpaar begrenzten Bereiche jeder der in der Probe tatsächlich enthaltenen DNA der 15 HAdV-Serotypen,
- Einstellen von Bedingungen, die eine spezifische Bindung der Sonde  
25 an Abschnitte der amplifizierten Bereiche ermöglichen,
- Detektieren amplifizierter DNA-Abschnitte, an die eine Sonde gebunden ist.

30

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, dass zum Amplifizieren keine degenerierten Primer verwendet werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass zum Amplifizieren weniger als 11, bevorzugt weniger als 5, wiederum bevorzugt weniger als 3 zu einander verschiedene Primer eingesetzt werden.

35

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 als Primer zum Amplifizieren eingesetzt werden.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-7, dadurch gekennzeichnet, dass als Sonde eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-8, dadurch gekennzeichnet, dass der amplifizierte Bereich  $\leq 500$ , bevorzugt  $\leq 300$  wiederum bevorzugt  $\leq 150$  Basenpaare umfasst.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten DNA-Bereiche unter real time Bedingungen (a) während und/oder (b) nach einem, mehreren oder jedem Amplifikationsschritt erfolgt.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten DNA-Bereiche quantitativ erfolgt.
- 20 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-11, dadurch gekennzeichnet, dass als Primer Nukleinsäuren, die nach Anspruch 1 homolog zu den Sequenzen SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 sind und/oder als Sonde eine markierte Nukleinsäure, die nach Anspruch 1 zu der Sequenz SEQ ID NO. 3 homolog oder zu einer solchen homologen komplementär ist, verwendet werden.
- 25 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-12, dadurch gekennzeichnet, dass ein TaqMan PCR-Verfahren zur Amplifikation und Detektion verwendet wird.
- 30 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-13, dadurch gekennzeichnet, dass im Amplifikationsschritt die Primerbindung (annealing) bei  $\geq 48^\circ\text{C}$ , bevorzugt bei  $\geq 50^\circ\text{C}$ , weiter bevorzugt bei  $\geq 53^\circ\text{C}$ , wiederum bevorzugt bei  $\geq 55^\circ\text{C}$  erfolgt.

15. Kit, umfassend Primerpaar und Sonde, jeweils bestehend aus Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1.

16. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 oder  
5 eines Kits gemäß Anspruch 15 zum Nachweis von HAdV-DNA.

17. Verfahren zum Charakterisieren von HAdV-Serotypen mit folgenden Schritten:

- Nachweis von HAdV-DNA in einer Probe gemäß einem der Ansprüche  
10 2-14
- Charakterisieren in der Probe enthaltener nachgewiesener HAdV-DNA

1/2

|           |      |   |         |
|-----------|------|---|---------|
|           |      | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....       |         |
|           |      | 18861   | 18911   |
| HADV-2    | (C)  | TGCCGCAGTG GTCTTACATG CACATCTCGG GCCAGGACGC CTCGGAGTAC CTGAGCCCCG |         |
| HADV-3    | (B1) | ....C..A.. .G.A..... .G.C. .A....T.. T....G.... ..C..T..G.        |         |
| HADV-4    | (E)  | ....C..... .G.G..... .G.C. .A..... T..... ..T..G.                 |         |
| HADV-5    | (C)  | .....   |         |
| HADV-12   | (A)  | ..... .G.C. .T....T.. ..T....                                     |         |
| HADV-17   | (D)  | ..... .G.G..... .G.C. .G..... ..G.                                |         |
| HADV-34   | (B2) | ....C..... .G.A..... .G.C. .A....T.. T..... ..T..G.               |         |
| HADV-40   | (F)  | .....A..... .G.C. .G..... ..G.                                    |         |
| HADV-41   | (F)  | .....A..... .G.C. .G..... ..T ..G.                                |         |
| HADV-48   | (D)  | ..... .G.G..... .G.C. .G..... ..G.                                |         |
| consensus |      | ....C..... (=AQ2)   | .....G. |

|           |      |   |       |
|-----------|------|---|-------|
|           |      | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....       |       |
|           |      | 18921   | 18971 |
| HADV-2    | (C)  | GGCTGGTGCA GTTTGCCCCG GCCACCGAGA CGTACTTCAG CCTGAATAAC AAGTTTAGAA |       |
| HADV-3    | (B1) | .T..... ..C.....T ..A..A..C. .C..... TA..GGG... ..A.....          |       |
| HADV-4    | (E)  | .T..... ..C..... ..A..A..C. .C..... T...GGG... ..G.               |       |
| HADV-5    | (C)  | .....   |       |
| HADV-12   | (A)  | .T..... A..C..... ..G..C. .C.....C ..GGA... ..G.                  |       |
| HADV-17   | (D)  | .T..... ..C..... ..A..C. .C.....A T..TGGA..T ..G.                 |       |
| HADV-34   | (B2) | .T..... ..C..... ..A..C. .C.....A T..TGGA..T ..G.                 |       |
| HADV-40   | (F)  | .C..... ..C.....T ..T..C. .C..... ..GGG... ..C....                |       |
| HADV-41   | (F)  | .C..... A..... ..T..C. .C..... ..GGG... ..C....                   |       |
| HADV-48   | (D)  | .T..... ..C..... ..GGA... ..G.                                    |       |
| consensus |      | .T..... (=AP)   | ..... |

|           |      |                         |                        |      |      |  |
|-----------|------|-------------------------|------------------------|------|------|--|
|           |      | ..... ..... ..... ..... | Schmelztemperatur (°C) |      |      |  |
|           |      | 18981                   | AQ2                    | AP   | AQ1  |  |
| HADV-2    | (C)  | ACCCACGCGT GGCACCTACG   | 62.5                   | 71.9 | 61.2 |  |
| HADV-3    | (B1) | .....A.. ..G..C..C      | 54.6                   | 71.3 | 54.4 |  |
| HADV-4    | (E)  | ..... ..G.....C         | 60.5                   | 76.1 | 54.6 |  |
| HADV-5    | (C)  | ..... ..G.....          | 62.5                   | 71.9 | 61.2 |  |
| HADV-12   | (A)  | .....C.. ..T..C..C      | 62.5                   | 68.9 | 67.5 |  |
| HADV-17   | (D)  | ..... ..C..G..C         | 50.6                   | 79.0 | 57.8 |  |
| HADV-34   | (B2) | .T.....C.. A..G..G..C   | 60.4                   | 76.1 | 54.6 |  |
| HADV-40   | (F)  | .....C.. ..T..C..C      | 57.3                   | 76.1 | 63.8 |  |
| HADV-41   | (F)  | .T.....T.. ..T..G..C    | 57.3                   | 73.1 | 51.4 |  |
| HADV-48   | (D)  | ..... ..C..G..C         | 50.6                   | 79.0 | 57.1 |  |
| consensus |      | .....C.. .. (=AQ1)      |                        |      |      |  |

FIG. 1

2/2

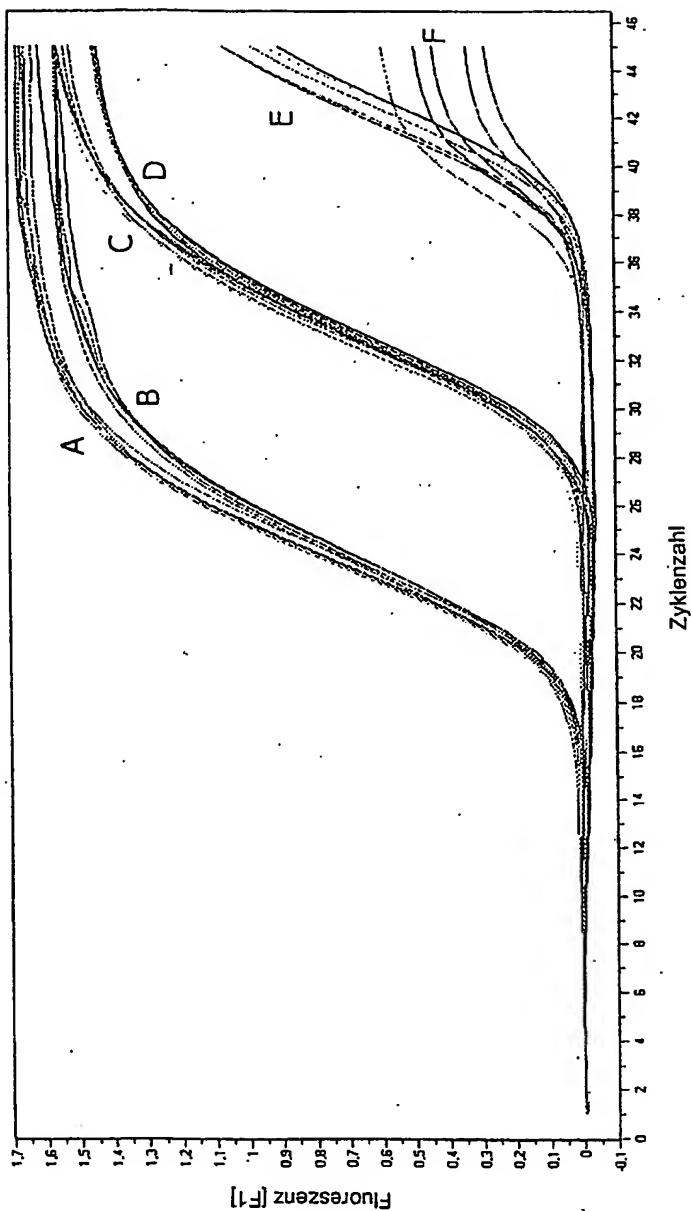


FIG. 2



JC20 Rec'd PCT/PTO 16 MAY 2008

## SEQUENCE LISTING

<110> Medizinische Hochschule Hannover

5 <120> Mittel und Verfahren zum Nachweis humaner Adenoviren

<130> MA 7216-01WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

10

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> Consensussequenz fuer HAdV

<400> 1

gccacggtgg ggtttctaaa ctt

23

20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Consensussequenz fuer HAdV

<400> 2

gccccagtgg tcttacatgc acatc

25

30 <210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensussequenz fuer HA $\delta$ V

<400> 3

5 tgcaccagac ccgggctcag gtactccga

29

PCT/EP 02/12756Box II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1, 7, 8, 12, 15, 16 (in part)

Nucleic acid SEQ ID NO: 1

2. Claims 1, 7, 8, 12, 15, 16 (in part)

Nucleic acid SEQ ID NO: 2

3. Claims 1, 7, 8, 12, 15, 16

Nucleic acid SEQ ID NO: 3

4. Claims 2-6, 9-11, 13-14, 17 and 7, 8, 12, 16 (in part)

Method for detecting HAdv-DNA, kit and use thereof

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/12756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>23 March 1999 (1999-03-23)<br>"PCR primer used to amplify a 300 bp<br>fragment of Adenovirus"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AAX03293<br>XP002258016<br>abstract | 1                     |
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>25 September 2002 (2002-09-25)<br>"Adenovirus detection related hexon<br>oligonucleotide AV1"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AAL40501<br>XP002258017<br>abstract | 1                     |
|            | ---<br>-/-  |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

31 October 2003

Date of mailing of the International search report

13/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Voigt, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/12756

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
|------------|--|------------------------|
| X          | WO 02 67861 A (NOVARTIS PHARMA AG)<br>6 September 2002 (2002-09-06)<br>Seq Id No: 26<br>example 4  | 1                      |
| X          | ---<br>DATABASE 'Online!<br>EMBL; 5 August 1999 (1999-08-05)<br>"Human adenovirus type 14 hexon protein<br>gene"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AF161571<br>XP002258018<br>abstract   | 1                      |
| X          | ---<br>DATABASE 'Online!<br>EMBL; 21 November 2001 (2001-11-21)<br>"Sequence 4402 from patent WO0179548"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AX292640<br>XP002258019<br>abstract   | 1                      |
| X          | ---<br>DATABASE 'Online!<br>EMBL; 15 February 2002 (2002-02-15)<br>"Capture oligonucleotide Zip ID 4402<br>oligo 2"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AB191201<br>XP002258020<br>abstract  | 1                      |
| X          | ---<br>ALLARD ANNIKA ET AL: "Rapid typing of<br>human adenoviruses by a general PCR<br>combined with restriction endonuclease<br>analysis"<br>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 39, no. 2, February 2001 (2001-02),<br>pages 498-505, XP002258012<br>ISSN: 0095-1137<br>cited in the application<br>page 499, column 1, paragraph 5<br>page 499, column 2, paragraph 2 | 3,6,9,14               |
| X          | ---<br>LANKESTER A C ET AL: "Quantification of<br>adenovirus DNA in plasma for management of<br>infection in stem cell graft recipients"<br>CLINICAL INFECTIOUS DISEASES,<br>vol. 34, no. 6,<br>15 March 2002 (2002-03-15), pages 864-867,<br>XP002258013<br>ISSN: 1058-4838<br>page 864, column 2, line 42 -page 865,<br>column 1, line 1                                     | 4-6,<br>9-11,13,<br>14 |
|            | ---<br>-/-   |                        |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12756

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.     |
|------------|---|---------------------------|
| X          | XU WANHONG ET AL: "Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay"<br>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 38, no. 11, November 2001 (2001-11),<br>pages 4114-4120, XP002258014<br>ISSN: 0095-1137<br>cited in the application<br>table 1<br>abstract  | 3,6,9,14                  |
| X          | HEIM ALBERT ET AL: "Quantitative, "real time" PCR for the generic detection of human adenoviruses"<br>INFECTION,<br>vol. 30, no. Supplement 1,<br>May 2002 (2002-05), page 20 XP009019042<br>ConVir 2002 European Conference on Viral Diseases;Munich, Germany; May 10-12, 2002<br>ISSN: 0300-8126<br>the whole document  | 2-6,<br>9-11,13,<br>14,17 |
| X          | ECHAVARRIA M ET AL: "PCR METHOD FOR DETECTION OF ADENOVIRUS IN URINE OF HEALTHY AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED INDIVIDUALS"<br>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br>WASHINGTON, DC, US,<br>vol. 36, no. 11, November 1998 (1998-11),<br>pages 3323-3326, XP000957714<br>ISSN: 0095-1137<br>cited in the application<br>page 3324, column 2, paragraph 3<br>table 1<br>page 3326, column 1, line 3 - line 7 | 4-6,9,<br>11,14           |
| X          | MA LIBIN ET AL: "Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR"<br>JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS,<br>vol. 93, no. 1-2, April 2001 (2001-04),<br>pages 181-188, XP002259893<br>ISSN: 0166-0934<br>abstract<br>page 182, column 2, paragraph 2<br>figure 1<br>page 188, column 1, line 12 - line 15  | 2-6,<br>9-11,13,<br>14,17 |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12756

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | <p>HIERHOLZER JOHN C ET AL: "Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 7, 1993, pages 1886-1891, XP009019104</p> <p>ISSN: 0095-1137</p> <p>page 1887, column 1, paragraph 3 - paragraph 5</p> <p>figure 1</p> <p>page 1888, column 1, paragraph 2 - paragraph 3</p> | 2-6,9,11,14           |
| T          | <p>HEIM ALBERT ET AL: "Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR."</p> <p>JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY. UNITED STATES JUN 2003, vol. 70, no. 2, June 2003 (2003-06), pages 228-239, XP009018909</p> <p>ISSN: 0146-6615</p> <p>the whole document</p>   | 1-17                  |
| A          | <p>HOLLAND P M ET AL: "DETECTION OF SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION PRODUCT BY UTILIZING THE 5' -&gt;3' EXONUCLEASE ACTIVITY OF THERMUS AQUATICUS DNA POLYMERASE"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 88, no. 16, 1 August 1991 (1991-08-01), pages 7276-7280, XP000606188</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>the whole document</p>                     | 1-17                  |
| X          | <p>WO 01 59163 A (AVENTIS PHARMA SA ; ROUSSY INST GUSTAVE (FR); VIDAUD MICHEL (FR); G)</p> <p>16 August 2001 (2001-08-16)</p> <p>page 14, paragraphs 3,5</p> <p>page 2, paragraph 5</p> <p>page 6, paragraph 2</p>  | 4,10                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/12756

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0267861                                | A | 06-09-2002          | WO 02067861 A2             | 06-09-2002          |
|   |   |                     | US 2003104625 A1           | 05-06-2003          |
| WO 0159163                                | A | 16-08-2001          | FR 2804692 A1              | 10-08-2001          |
|   |   |                     | AU 3562601 A               | 20-08-2001          |
|   |   |                     | CA 2399364 A1              | 16-08-2001          |
|   |   |                     | CN 1406285 T               | 26-03-2003          |
|   |   |                     | EP 1257672 A2              | 20-11-2002          |
|   |   |                     | WO 0159163 A2              | 16-08-2001          |
|   |   |                     | HU 0204549 A2              | 28-04-2003          |
|   |   |                     | JP 2003522535 T            | 29-07-2003          |
|   |   |                     | US 2002061516 A1           | 23-05-2002          |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12756

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EMBL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>23. März 1999 (1999-03-23)<br>"PCR primer used to amplify a 300 bp<br>fragment of Adenovirus"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AAX03293<br>XP002258016<br>Zusammenfassung  | 1                  |
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>25. September 2002 (2002-09-25)<br>"Adenovirus detection related hexon<br>oligonucleotide AV1"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AAL40501<br>XP002258017<br>Zusammenfassung | 1                  |

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Q\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

31. Oktober 2003

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

13/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Voigt, H

## INTERNATIONALER SCHERCHENBERICHT

International Aktenzeichen

PCT/EP 02/12756

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.     |
|------------|---|------------------------|
| X          | WO 02 67861 A (NOVARTIS PHARMA AG)<br>6. September 2002 (2002-09-06)<br>Seq Id No: 26<br>Beispiel 4<br>---  | 1                      |
| X          | DATABASE 'Online!<br>EMBL; 5. August 1999 (1999-08-05)<br>"Human adenovirus type 14 hexon protein<br>gene"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AF161571<br>XP002258018<br>Zusammenfassung<br>---  | 1                      |
| X          | DATABASE 'Online!<br>EMBL; 21. November 2001 (2001-11-21)<br>"Sequence 4402 from patent W00179548"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AX292640<br>XP002258019<br>Zusammenfassung<br>---  | 1                      |
| X          | DATABASE 'Online!<br>EMBL; 15. Februar 2002 (2002-02-15)<br>"Capture oligonucleotide Zip ID 4402<br>oligo 2"<br>retrieved from EBI<br>Database accession no. AB191201<br>XP002258020<br>Zusammenfassung<br>---  | 1                      |
| X          | ALLARD ANNIKA ET AL: "Rapid typing of<br>human adenoviruses by a general PCR<br>combined with restriction endonuclease<br>analysis"<br>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br>Bd. 39, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02),<br>Seiten 498-505, XP002258012<br>ISSN: 0095-1137<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 499, Spalte 1, Absatz 5<br>Seite 499, Spalte 2, Absatz 2<br>--- | 3,6,9,14               |
| X          | LANKESTER A C ET AL: "Quantification of<br>adenovirus DNA in plasma for management of<br>infection in stem cell graft recipients"<br>CLINICAL INFECTIOUS DISEASES,<br>Bd. 34, Nr. 6, 15. März 2002 (2002-03-15),<br>Seiten 864-867, XP002258013<br>ISSN: 1058-4838<br>Seite 864, Spalte 2, Zeile 42 -Seite 865,<br>Spalte 1, Zeile 1<br>---<br>-/-                        | 4-6,<br>9-11,13,<br>14 |

## INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 02/12756

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.        |
|------------|---|---------------------------|
| X          | <p>XU WANHONG ET AL: "Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br/>Bd. 38, Nr. 11, November 2001 (2001-11),<br/>Seiten 4114-4120, XP002258014<br/>ISSN: 0095-1137<br/>in der Anmeldung erwähnt<br/>Tabelle 1<br/>Zusammenfassung</p>  | 3,6,9,14                  |
| X          | <p>HEIM ALBERT ET AL: "Quantitative, "real time" PCR for the generic detection of human adenoviruses"</p> <p>INFECTION,<br/>Bd. 30, Nr. Supplement 1,<br/>Mai 2002 (2002-05), Seite 20 XP009019042<br/>ConVir 2002 European Conference on Viral Diseases;Munich, Germany; May 10-12, 2002<br/>ISSN: 0300-8126<br/>das ganze Dokument</p>  | 2-6,<br>9-11,13,<br>14,17 |
| X          | <p>ECHAVARRIA M ET AL: "PCR METHOD FOR DETECTION OF ADENOVIRUS IN URINE OF HEALTHY AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED INDIVIDUALS"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br/>WASHINGTON, DC, US,<br/>Bd. 36, Nr. 11, November 1998 (1998-11),<br/>Seiten 3323-3326, XP000957714<br/>ISSN: 0095-1137<br/>in der Anmeldung erwähnt<br/>Seite 3324, Spalte 2, Absatz 3<br/>Tabelle 1<br/>Seite 3326, Spalte 1, Zeile 3 - Zeile 7</p> | 4-6,9,<br>11,14           |
| X          | <p>MA LIBIN ET AL: "Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS,<br/>Bd. 93, Nr. 1-2, April 2001 (2001-04),<br/>Seiten 181-188, XP002259893<br/>ISSN: 0166-0934<br/>Zusammenfassung<br/>Seite 182, Spalte 2, Absatz 2<br/>Abbildung 1<br/>Seite 188, Spalte 1, Zeile 12 - Zeile 15</p>   | 2-6,<br>9-11,13,<br>14,17 |

-/--

## INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 02/12756

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | HIERHOLZER JOHN C ET AL: "Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry"<br>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,<br>Bd. 31, Nr. 7, 1993, Seiten 1886-1891,<br>XP009019104<br>ISSN: 0095-1137<br>Seite 1887, Spalte 1, Absatz 3 - Absatz 5<br>Abbildung 1<br>Seite 1888, Spalte 1, Absatz 2 - Absatz 3 | 2-6,9,<br>11,14    |
| T          | HEIM ALBERT ET AL: "Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR."<br>JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY. UNITED STATES<br>JUN 2003,<br>Bd. 70, Nr. 2, Juni 2003 (2003-06), Seiten<br>228-239, XP009018909<br>ISSN: 0146-6615<br>das ganze Dokument   | 1-17               |
| A          | HOLLAND P M ET AL: "DETECTION OF SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION PRODUCT BY UTILIZING THE 5' ->3' EXONUCLEASE ACTIVITY OF THERMUS AQUATICUS DNA POLYMERASE"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,<br>Bd. 88, Nr. 16,<br>1. August 1991 (1991-08-01), Seiten<br>7276-7280, XP000606188<br>ISSN: 0027-8424<br>das ganze Dokument     | 1-17               |
| X          | WO 01 59163 A (AVENTIS PHARMA SA ; ROUSSY<br>INST GUSTAVE (FR); VIDAUD MICHEL (FR); G)<br>16. August 2001 (2001-08-16)<br>Seite 14, Absätze 3,5<br>Seite 2, Absatz 5<br>Seite 6, Absatz 2   | 4,10               |

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: teilweise: 1,7,8,12,15,16

Nukleinsäure Seq ID No.1

2. Ansprüche: teilweise: 1,7,8,12,15,16

Nukleinsäure Seq ID No.2

3. Ansprüche: teilweise: 1,7,8,12,15,16

Nukleinsäure Seq ID No.3

4. Ansprüche: 2-6,9-11,13-14,17 und teilweise: 7,8,12,16

Verfahren zum Nachweis von HAdV-DNA, Kit und dessen Verwendung

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/12756

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
2. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich \_\_\_\_\_
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: \_\_\_\_\_

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationalen Kennzeichen

PCT/EP 02/12756

| Im Recherchebericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0267861 A                                      | 06-09-2002                    | WO 02067861 A2                    | 06-09-2002                    |
|   |                               | US 2003104625 A1                  | 05-06-2003                    |
| WO 0159163 A                                      | 16-08-2001                    | FR 2804692 A1                     | 10-08-2001                    |
|   |                               | AU 3562601 A                      | 20-08-2001                    |
|   |                               | CA 2399364 A1                     | 16-08-2001                    |
|   |                               | CN 1406285 T                      | 26-03-2003                    |
|   |                               | EP 1257672 A2                     | 20-11-2002                    |
|   |                               | WO 0159163 A2                     | 16-08-2001                    |
|   |                               | HU 0204549 A2                     | 28-04-2003                    |
|   |                               | JP 2003522535 T                   | 29-07-2003                    |
|   |                               | US 2002061516 A1                  | 23-05-2002                    |